

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-176622

(43)Date of publication of application : 02.07.1999

(51)Int.Cl. H01F 1/113
C08F 2/18
C08F 2/44
// C07H 1/06
C07H 21/04
C12N 15/00
C12Q 1/68
G01N 33/50
G01N 33/543
G01N 33/545
G01N 33/553

(21)Application number : 09-354181

(71)Applicant : JSR CORP

(22)Date of filing : 08.12.1997

(72)Inventor : HAN KAKUN

(54) MAGNETIC PARTICLE AND CARRIER FOR NON-SPECIFIC NUCLEIC ACID COUPLING

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a magnetic particle suitable for a carrier for non-specific nucleic acid coupling.

SOLUTION: A magnetic particles is made of (co)polymer having a structure unit derived from alkyl(meta)acrylate with an alkyl group having 4 to 20 carbons and super paramagnetic material. The particle has a positive net surface charge in a aqueous solvent having a pH of 3 to 11. A carrier for non-specific nucleic acid coupling is made of the magnetic particle.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 16.12.2002

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 07.03.2006

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-176622

(43) 公開日 平成11年(1999) 7 月 2 日

(51) Int.Cl. ⁴	識別記号	F I	
H 0 1 F 1/113		H 0 1 F 1/113	
C 0 8 F 2/18		C 0 8 F 2/18	
	2/44		2/44 A
// C 0 7 H 1/06		C 0 7 H 1/06	
	21/04		21/04 Z
審査請求 未請求 請求項の数 2 F D (全 5 頁) 最終頁に続く			
(21) 出願番号	特願平9-354181	(71) 出願人	000004178 ジェイエスアール株式会社 東京都中央区築地 2 丁目 11 番 24 号
(22) 出願日	平成 9 年 (1997) 12 月 8 日	(72) 発明者	范 可君 東京都中央区築地二丁目11番24号 日本合 成ゴム株式会社内

(54) 【発明の名称】 磁性粒子および非特異性核酸結合用担体

(57) 【要約】

【目的】 非特異性核酸結合用担体に適した磁性粒子を得る。

【構成】 (A) アルキル基の炭素数が 4 ～ 2 0 であるアルキル (メタ) アクリレートに由来する構造単位を有する (共) 重合体ならびに超常磁性体からなり、p H 3 ～ p H 1 1 における水系溶媒中で正味の表面荷電が正であることを特徴とする磁性粒子ならびに該磁性粒子からなることを特徴とする非特異性核酸結合用担体。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (A) アルキル基の炭素数が4～20であるアルキル (メタ) アクリレートに由来する構造単位を有する (共) 重合体ならびに超常磁性体からなり、pH 3～pH 11における水系溶媒中で正味の表面荷電が正であることを特徴とする磁性粒子。

【請求項2】 請求項1記載の磁性粒子からなることを特徴とする非特異性核酸結合用担体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

【0002】 本発明は磁性粒子に関し、特に非特異性核酸結合用担体に関する。

【従来の技術】 従来から、核酸の単離方法として、核酸が共有結合し得るポリマー粒子を使用することが知られている。なかでも、生体材料中の核酸を非特異的に結合でき、さらに磁性により回収することが可能な担体は核酸の分離精製工程を自動化する上で望まれていた。このような、磁性を有する非特異性核酸結合用担体としては、例えば重合性シラン被膜に覆われた超常磁性酸化鉄からなるシリカ系磁性粒子が知られている。また、特開平6-47273号公報には表面を水和金属化合物で被覆した有機または無機顔料を、無機質多孔性壁物質で包接したほぼ完全な球状からなる着色球状微粒子が開示されており、特開平9-19292号公報には前記特開平6-47423号で開示された磁性シリカ粒子を用いた核酸結合用磁性担体が開示されている。しかしながら、これらの磁性粒子はアルカリ pH 領域におけるシリカの不安定性から、中性あるいは酸性 pH 領域下での使用に限定されていた。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、広い pH 範囲に於いて効率よく核酸を回収するための非特異性核酸結合用担体を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明は、(A) アルキル基の炭素数が4以上であるアルキル (メタ) アクリレートに由来する構造単位 (以下、「構造単位 A」という) を有する (共) 重合体 (以下、「特定 (共) 重合体」という) ならびに超常磁性体からなり、pH 3～pH 11 における水系溶媒中で正味の表面荷電が正であることを特徴とする磁性粒子ならびに該磁性粒子からなる非特異性核酸結合用担体を提供するものである。

【0005】 以下、本発明の磁性粒子について詳細に説明する。本発明の磁性粒子を構成する磁性体は、超常磁性体を構成する材質であることが好ましい。斯かる超常磁性体としては、例えば四三酸化鉄 (Fe_3O_4)、 γ -重三酸化鉄 ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)、各種フェライト、鉄、マンガン、コバルト、クロムなどの金属、コバルト、ニッケル、マンガンなどの合金を挙げることがで

き、これらのうち、四三酸化鉄が特に好ましい。磁性粒子を構成する磁性体の粒子径は、40～300 Å であることが好ましく、更に好ましくは50～200 Å、特に好ましくは60～150 Å とされる。この粒子径が40 Å 未満である場合には、当該磁性体を親油化处理するための処理剤 (脂肪酸、シランカップリング剤、チタンカップリング剤) が多量に必要となり、当該磁性体の割合が低下して、磁気応答性が不良となることがある。一方、この粒子径が300 Å を超える場合には、得られる磁性粒子が磁化されたものとなり、当該磁性粒子が相互に凝集して水性媒体中で沈降しやすくなる。なお、球状でない磁性体の粒子径としては、それぞれの磁性体の最長径と最短径との平均値をとるものとする。

【0006】 磁性粒子における磁性体の含有割合としては、特定 (共) 重合体100重量部に対して、1～300重量部であることが好ましく、更に好ましくは5～200重量部、特に好ましくは10～100重量部とされる。磁性体の含有割合が1重量部未満である場合には、これを含有する磁性粒子が十分な磁気応答性を発現することができず、一方、含有割合が300重量部を超える場合には、得られる磁性粒子の粒子表面に磁性体が露出して鉄イオンの溶出などの問題を招き、また、磁性粒子が脆くなって実用的な強度を有するものとならない。

【0007】 本発明において特定 (共) 重合体はカチオン性基を有することが好ましい。特定 (共) 重合体がカチオン性基を有するためには、(1) 特定 (共) 重合体を製造する際に、カチオン性モノマーを共重合する、

(2) アニオン性 (共) 重合体を重合後、カチオン性ポリマーで表面修飾する方法が挙げられる。

方法 (1)

本発明において特定 (共) 重合体を構成する構造単位 A において、アルキル基の炭素数は4以上、好ましくは4～18、特に好ましくは6～12である。また、前記アルキル基は、鎖状であっても環状であってもよい。アルキル基の炭素数が4以上であるアルキル (メタ) アクリレートの具体例としては、例えばブチル (メタ) アクリレート、2-エチルヘキシル (メタ) アクリレート、ラウリル (メタ) アクリレート、トリデシル (メタ) アクリレート、ステアリル (メタ) アクリレート、シクロヘキシル (メタ) アクリレート、ベンジル (メタ) アクリレートなどの炭素数4～18のアルキル基を有する (メタ) アクリル酸アクリル酸アルキルエステル; 「ビスコート 8 F」、「ビスコート 17 F」〔大阪有機化学工業 (株) 製〕などとして市販されているフッ素系の (メタ) アクリル酸アルキルエステルなどを挙げることができる。これらは単独でまたは2種以上組み合わせ使用することができる。これらのうち、2-エチルヘキシル (メタ) アクリレートおよびシクロヘキシル (メタ) アクリレートなどが特に好ましい。

【0008】 さらに、上記アルキル基の炭素数が4以上

のアルキル（メタ）アクリレートと共重合するカチオン性モノマーの具体例としては、2-ジメチルアミノエチル（メタ）アクリレート、2-ジエチルアミノエチル（メタ）アクリレート、2-アミノエチル（メタ）アクリレート、2-ジメチルアミノプロピル（メタ）アクリレート、3-ジメチルアミノプロピル（メタ）アクリレートなどのアミノアルキル基含有（メタ）アクリレート、2-（ジメチルアミノエトキシ）エチル（メタ）アクリレート、2-（ジエチルアミノエトキシ）エチル（メタ）アクリレート、ジメチルアミノプロピルメタクリルアミド、3-（ジメチルアミノエトキシ）プロピル（メタ）アクリレートなどのアミノアルコキシアルキル基含有（メタ）アクリレート、N-（2-ジメチルアミノエチル）（メタ）アクリルアミド、N-（2-ジエチルアミノエチル）（メタ）アクリルアミド、N-（2-ジメチルアミノプロピル）（メタ）アクリルアミドなどのアミノアルキル基含有（メタ）アクリルアミド、p-（2-ジメチルアミノエチル）スチレン、p-（2-ジエチルアミノエチル）スチレン、2-ビニルピリジン、4-ビニルピリジン、4-ビニルベンジルアミンなどのカチオン性芳香族ビニル化合物、グリシジル（メタ）アクリレートと第1級または第2級アミンとの付加物などや、これらのカチオン性基を中和あるいは第四級化した塩を使用することもできる。

【0009】また、特定（共）重合体は上記以外のビニルモノマーが共重合されていてもよく、例えばメチル（メタ）アクリレート、エチル（メタ）アクリレート、グリシジル（メタ）アクリレート、2-メトキシエチル（メタ）アクリレート、ブトキシエチル（メタ）アクリレート、カルビトールアクリレート、メチルトリグリコールアクリレート、テトラヒドロフルフリル（メタ）アクリレート、シアノエチル（メタ）アクリレート、2-ヒドロキシエチルアクリロイルホスフェート、2-ヒドロキシエチル（メタ）アクリレート、2-ヒドロキシプロピル（メタ）アクリレート、エチレングリコールジ（メタ）アクリレート、ジエチレングリコールジ（メタ）アクリレート、トリエチレングリコールジ（メタ）アクリレート、テトラエチレングリコールジ（メタ）アクリレート、ジアリルフタレートなどの（メタ）アクリル酸エステル；酢酸ビニル、モノクロロ酢酸ビニル、メタクリル酸ビニル、クロトン酸ビニルなどのカルボン酸ビニルエステル；アクリル酸、メタクリル酸、クロトン酸などのモノカルボン酸；イタコン酸、マレイン酸、無水マレイン酸などのジカルボン酸およびその無水物；スチレン、ジビニルベンゼンなどの芳香族系化合物；アクリロニトリル、メタクリロニトリルなどのシアン化ビニル化合物を例示することができ、これらは単独でまたは2種以上組み合わせ使用することができる。これらのうち、メチル（メタ）アクリレート、エチレングリコー

ルジ（メタ）アクリレート、モノカルボン酸、ジカルボン酸などが特に好ましい。

【0010】本発明において、アルキル基の炭素数が4以上のアルキル（メタ）アクリレートは特定（共）重合体の30～99重量%、好ましくは50～98重量%、カチオン性モノマーは1～50重量%、好ましくは10～40重量%、その他のビニルモノマーは0～70重量%、好ましくは0～3重量%である。

方法（2）

上記方法（1）で例示したアルキル基の炭素数が4以上のアルキル（メタ）アクリレートおよび必要に応じて他のビニルモノマーを用いて特定（共）重合体を製造後、カチオン性ポリマーで表面修飾する。ここで、使用することのできるカチオン性ポリマーは3-アミノプロピル基、2-ミノエチル-3-アミノプロピル基、ペンタメチル-2-アミノエチル-3-アミノプロピル基、トリス（2-アミノエチル）アミノ基などを有するポリマー、例えば、ポリリジン、ポリアルギニン、ポリエチレンイミン、ポリアリアルアミン、スベルミン、スベルミンなどである。本発明の磁性粒子は、上記の磁性体が特定（共）重合体中に均一または不均一に分散してなるものである。本発明の磁性粒子の製造方法は、上記特定（共）重合体を構成するモノマー中に、磁性粒子を混合したモノマー混合物を、水系媒体中で乳化重合することにより製造することができる。本発明の磁性粒子はpH3～pH11における水系溶媒中での正味の表面荷電が正であることが必要である。本発明において正味の表面荷電が正であるということは、固形分濃度0.01%の磁性ポリマーラテックスを20mM Tris緩衝液（pH8）中に分散し、電位勾配中での粒子の移動方向を顕微鏡で観察する電気泳動により測定した場合に、粒子が正方向へ移動するものを示す。本発明において磁性粒子の表面荷電の絶対量（ネットチャージ）は、必要に応じて磁性粒子をイオン交換樹脂で予め洗浄後、通常行われている塩基または酸を用いる滴定で測定することができる。本発明の磁性粒子の数平均粒子径は、通常0.02～10μmとされ、好ましくは0.05～5μm、さらに好ましくは0.1～2μmとされる。数平均粒子径が0.02μm未満である場合には、十分な磁気応答性を発現することができない。一方、数平均粒子径が10μmを超える場合には、当該磁性粒子が水性媒体中で沈降しやすくなり、また、当該磁性粒子は粒子表面積が小さいものとなり、特定物質の吸着剤としてこれを用いる場合に、十分な量の目的物質を吸着することができない。

【0011】本発明の磁性粒子は、水性媒体中で沈降しにくく、当該水性媒体中において均質な分散状態で存在できること（以下、この特性を「静置安定性」ともいう。）が取扱性の観点から好ましい。具体的には、磁性ポリマー粒子を水性媒体に分散させて固形分濃度が1重

量%の磁性ポリマーラテックスを調製し、この磁性ポリマーラテックスを液相の高さが2 cmになるよう容器内に収容し、磁性ポリマー粒子が均一に分散されるまで容器を振盪した後、10分間静置したときに、液面から液面下1 cmに至る液相の上層部分の固形分濃度が0.1重量%以上であることが好ましく、更に好ましくは0.3重量%以上、特に好ましくは0.6重量%以上とされる。

【0012】また、本発明の磁性粒子は、その表面に、磁性体を含まないポリマーからなる層（以下「表面被覆層」ともいう）が形成されていることが好ましい。このような構成とすることにより、粒子内部に存在する磁性体による優れた取扱性が損なわれることなく、磁性ポリマー粒子からの鉄イオンの溶出を確実に防止することができる。ここで、表面被覆層の厚さは、使用する磁性体の最長径よりも大きいことが好ましく、通常100 Å以上とされる。本発明の磁性粒子は、非特異性核酸結合用担体として好適である。非特異性核酸結合担体として核酸を回収するには、通常、低塩濃度の緩衝液中で、非特異性核酸結合用担体に核酸を結合させ、磁力で担体を回収し、ついで高塩濃度の緩衝液で担体に吸着した核酸を溶出させる方法が用いられる。これ、緩衝液の種類、塩濃度は、非特異性核酸結合用担体の種類、核酸の存在する試料の状態によって適宜選択するが、一般に、リン酸緩衝液を使用し、核酸吸着時の塩濃度は500 mM未満、核酸溶出時の塩濃度は500 mM以上である。

【0013】

【実施例】以下、本発明の実施例を説明するが、本発明は、これらの実施例によって限定されるものではない。なお、以下において、「%」および「部」は、それぞれ、「重量%」および「重量部」を意味するものとする。

【0014】〔実施例1〕親油化処理された酸化鉄よりなる粉末状（粒子径80～120 Å）の超常磁性体40部を、2-エチルヘキシルアクリレート40部に添加し、この系を混合攪拌することにより超常磁性体を分散させた。次いで、油溶性重合開始剤として有機過酸化物「パーブチル O」〔日本油脂（株）製〕2部を添加・均一化してモノマー組成物を調製した。このようにして得られたモノマー組成物（有機相）を、ポリビニルアルコールの1%水溶液（水相）1000部に添加し、ホーン型発振子を備えてなる分散機を用いて乳化分散させて（分散粒子径：0.1～1 μm）懸濁液を調製した。次

いで、当該懸濁液を、窒素置換された容量2リットルのセパブルフラスコ内に移し替え、エチレングリコールジメタクリレート20部と、メチルメタクリレート35部と、4-ビニルベンジルアミン5部とを添加した後、この系を80℃に昇温し、窒素雰囲気下において回転数170 rpmで攪拌しながら6時間にわたり懸濁重合させることにより、本発明の磁性ポリマー粒子の分散体

（磁性ポリマーラテックス）を製造した。以上のようにして得られた磁性ポリマーラテックスは、重合転化率が99%、磁性ポリマー粒子中における超常磁性体の含有割合が21%、固形分濃度が13%の分散体であった。

〔比較例1〕実施例1において4-ビニルベンジルアミンを使用しない以外は実施例1と同様にして磁性ポリマーラテックスを製造した。

【0015】以上のようにして得られた磁性ポリマーラテックスについて、下記の項目を測定した。評価方法は下記のとおりである。結果を表1に示す。

＜磁性ポリマー粒子の数平均粒子径＞酢酸ウラニルで染色した後、透過型電子顕微鏡による磁性ポリマー粒子の電子顕微鏡写真を撮影し、無作為に選んだ500個以上の磁性ポリマー粒子の粒子径を測定して数平均粒子径を求めた。

＜超常磁性体の分散性の評価＞酢酸ウラニルで染色した後、透過型電子顕微鏡により磁性ポリマー粒子における超常磁性体の分散状態を観察し、ポリマー粒子の内部全体に均一に分散し、またはポリマー粒子の中心部に分散している場合を「良好」、ポリマー粒子の表面近傍の一部、または表面近傍の全部に局在化している場合を「不良」と判定した。

＜静置安定性の評価＞磁性ポリマーラテックスを希釈して固形分濃度（ c_0 ）を1%に調整し、この希釈液を、液相の高さが2 cmとなるよう容量20 mlのサンプルビン内に収容し、磁性ポリマー粒子が均一に分散されるまで容器を振盪した後10分間静置し、液面から液面下1 cmに至る上層部分のみを取り出して固形分濃度（ c ）を測定し、 $(c/c_0) \times 100$ で算出される値を静置安定指数（%）として求めた。

＜正味の表面荷電の正負＞電気泳動により測定した。固形分濃度0.01%の磁性ポリマーラテックスを20 mM Tris緩衝液（pH8）中に分散し、電位勾配中での粒子の移動方向を顕微鏡で観察した。

【0016】

【表1】

	実施例1	比較例2
数平均粒子径（μm）	1.4	1.3
超磁性体の分散性	良	良
静置安定性	70	63
正味の表面荷電の正負	正	負

【0017】〔実施例2〕実施例1および比較例1で調 50 製された磁性粒子（固形分5%）100 μlを取り、5

0 mMリン酸緩衝液 (pH 7) 50 ml 中に 50 mMの塩化ナトリウムを溶解した緩衝液中に、1% BSA 溶液中に溶解した DNA (0.5 mg/ml) 1 ml を加え、室温で 20 分間振とうした。その後、磁性粒子を磁力で回収し、その上澄の吸光度 A₂₆₀ および A₂₃₀ を測定した。ペレットに 50 mMリン酸緩衝液 (pH 7) / 1 M塩化ナトリウム溶液 1 ml を加え、室温で 2

0 分間振とうし、磁性粒子を回収した。得られた上澄の吸光度を A₂₆₀、A₂₈₀ で測定し、回収した DNA を求めた。DNA の添加量を変化させて同様の操作を行った。結果を表 2 に示す。

【0018】

【表 2】

	実施例 1				比較例 1			
添加 DNA 量 (mg)	0.1	0.5	2.5	10	0.1	0.5	2.5	10
回収 DNA 量 (mg)	0.1	0.49	2.4	10	0.1	0.25	0.4	0.5
純度 (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)	1.40	1.39	1.44	1.41	1.1	1.0	1.1	1.1

【0019】

【発明の効果】本発明の磁性粒子は、超磁性体の分散性

および安定性に優れ、非特性核酸結合担体として使用した場合に、核酸を効率よく回収することが可能である。

フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁶

識別記号

F I

C 1 2 N 15/00

Z N A

C 1 2 Q 1/68

Z

C 1 2 Q 1/68

G 0 1 N 33/50

P

G 0 1 N 33/50

33/543

5 4 1 A

33/543

5 4 1

33/545

Z

33/545

33/553

33/553

C 1 2 N 15/00

Z N A Z